

NUCLEIC ACID PROBE FOR DETECTING MEGASPHAERA CEREVISIAE AND METHOD FOR DETECTING TURBID BACTERIA IN BEER

Publication number: JP2002125677

Publication date: 2002-05-08

Inventor: MOTOYAMA YASUAKI; YASUHARA TAKAOMI;
TAKAHASHI KYOKO

Applicant: ASAHI BREWERIES LTD

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/04; C12Q1/68; C12M1/00;
C12M1/34; C12N15/09; C12Q1/04; C12Q1/68;
C12M1/00; C12M1/34; (IPC1-7): C12M1/00; C12M1/34;
C12N15/09; C12Q1/04; C12Q1/68

- european:

Application number: JP20000323658 20001024

Priority number(s): JP20000323658 20001024

Report a data error here

Abstract of JP2002125677

PROBLEM TO BE SOLVED: To detect Megasphaera cerevisiae which is a harmful bacterium for beer, identify or determine the quantity of the bacterium. SOLUTION: The gene sequence of a gene coding for 23S rRNA of the bacterium containing a part of or the whole of the base sequence expressed in a specific sequence which is the sequence for targeting 23S rDNA and 23S rRNA to selectively detect the bacterium and a single chain oligonucleotide having the specific sequence or a complementary strand are claimed in this invention.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

4/7

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-125677

(P2002-125677A)

(43) 公開日 平成14年5月8日 (2002.5.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/04		1/68	A 4 B 0 2 9
1/68			Z 4 B 0 6 3
		C 1 2 M 1/00	A
// C 1 2 M 1/00		1/34	B

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-323658(P2000-323658)

(22) 出願日 平成12年10月24日 (2000. 10. 24)

(71) 出願人 000000055

アサヒビール株式会社

東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72) 発明者 本山 靖朗

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

(72) 発明者 安原 貴臣

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

(74) 代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メガスフェラ・セレビシエ検出のための核酸プローブ、およびビール混濁細菌の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 ビール有害菌であるメガスフェラ・セレビシエ (*Megasphaera cerevisiae*) の検出、または該細菌の同定、または該細菌の定量を提供すること。

【解決手段】 特定の配列に示される塩基配列の一部または全部を含む該細菌の23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。該菌を選択的に検出するため、該菌の23S rDNAならびに23S rRNAを標的とする配列であって、該オリゴヌクレオチドが特定の配列を有するか、または対応する相補鎖を有することを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

FP05-0056 -0000-00
05.5.24
SEARCH REPORT

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含むメガスフェラ・セレビスエ (*Megasphaera cerevisiae*) の23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項2】メガスフェラ・セレビスエ (*Megasphaera cerevisiae*) を選択的に検出するため、メガスフェラ・セレビスエの23S rDNAならびに23S rRNAを標的とする配列であって、該オリゴヌクレオチドが配列番号2~28の少なくとも1つを有するか、または対応する相補鎖を有することを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項3】請求項1または2に記載されたオリゴヌクレオチドの配列群より選択される配列中のいずれか10個の連続したヌクレオチド単位を有するオリゴヌクレオチドを含むまたは少なくとも90%相同であることを特徴とする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項4】トレーサーで標識されていることを特徴とする請求項1~3のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項5】固体支持体上に固定化されていることを特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項6】試料から細菌を捕集する工程と、該細菌を請求項1~3のいずれか一項に記載のもののから選択されるオリゴヌクレオチドである1つまたは複数の核酸プローブと、適当なハイブリダイゼーション条件下に接触させる工程と、該プローブとサンプルの核酸との間のハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する工程からなることを特徴とするメガスフェラ・セレビスエの検出方法。

【請求項7】試料から細菌を捕集する工程と、該細菌を請求項1~3のいずれか一項に記載のもののから選択されるオリゴヌクレオチドである1つまたは複数の核酸プローブと、適当なハイブリダイゼーション条件下に接触させる工程と、該プローブとサンプルの核酸との間のハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する工程からなることを特徴とするメガスフェラ・セレビスエの同定方法。

【請求項8】細菌を捕集する方法が、遠心分離法またはメンブランフィルター捕集法のいずれかである、請求項6記載のメガスフェラ・セレビスエの検出方法。

【請求項9】細菌を捕集する方法が、遠心分離法またはメンブランフィルター捕集法のいずれかである、請求項6記載のメガスフェラ・セレビスエの検出方法。

【請求項10】ハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する方法が、FISH法 (fluorescence in situ hybridization)、ドットブロット法、サザンブロット法、ノーザンブロット法のいずれかである請求項6記載のメガスフェラ・セレビスエの検出方法。

【請求項11】ハイブリダイゼーション複合体の形成の

有無を測定する方法が、FISH法、ドットブロット法、サザンブロット法、ノーザンブロット法のいずれかである請求項7記載のメガスフェラ・セレビスエの同定方法。

【請求項12】数的に管理した対照細菌を試料中に意図的に混入させる工程と、該試料を請求項1~3のいずれか一項に記載のもののから選択されるオリゴヌクレオチドである1つまたは複数の核酸プローブと、適当なハイブリダイゼーション条件下に接触させる工程と、該プローブと該試料の細菌の核酸との間のハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する工程と、複合体形成のあった細菌と対照細菌の数から細菌の数を推定することを特徴とするメガスフェラ・セレビスエの定量方法。

【請求項13】ハイブリダイゼーション複合体の形成の有無を測定する方法がFISH法である請求項12記載のメガスフェラ・セレビスエの定量方法。

【請求項14】請求項1~3のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドをポリメラーゼ存在下での核酸増幅のためのヌクレオチドプライマーとして使用する方法。

【請求項15】請求項14に記載の方法で増幅させた核酸を、電気泳動法および核酸染色法により検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ビール有害菌であるメガスフェラ・セレビスエ (*Megasphaera cerevisiae*) の検出、または該細菌の同定、または該細菌の定量に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】近年のビールの生 (なま) 化への流れは、ビール鮮度という新たな価値観をもたらした。こうした背景から、ビール製造会社にとっては、製品製造から出荷までの時間が劇的に短縮するとともに、ビール有害菌の汚染を迅速に正確に判定する必要性が高まっている。偏性嫌気性菌である、ペクチネータス (*Pectinatus*) 属菌とその進化的近縁細菌であるメガスフェラ (*Megasphaera*) 属菌、セレンオモナス (*Selenomonas*) 属菌、ザイモフィラス (*Zymophilus*) 属菌は、ビール醸造技術の進展に伴う製品ビールの嫌気度が高まるにつれ検出頻度が高まりつつある。

【0003】従って、食品業界特にビール業界において使用できる、メガスフェラ属菌の迅速かつ選択的な検出を可能とするのに十分特異的で感度の高い細菌診断試験法を開発することは重要である。古典的なビール有害細菌の同定は、形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験などの多くの性状ならびに生化学的試験を行い、最終的に新鮮なビールに単離した細菌を再接種し、その増殖能の観察を行うことにより決定した。これらの一連の操作は、多くの時間と労力を要すると同時に正確な判定も困難な場合が多かった。また最近では、メガスフェラ・セ

レビスエのより迅速な検出・同定法についてはメガスフェラ・セレビスエからDNAを抽出して特定のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行い、標的配列を増幅させた後、メガスフェラ・セレビスエ特有の核酸の有無を判定する方法 (特開平10-323190) がある。しかし、これらの方法は標的核酸が存在すれば陽性に判定させるものであり、既にビール生育性がないか、もしくは活性の著しく弱い細菌とビール生育能を依然として保持している細菌とを区別できない。また、PCR法で再現よく、十分な感度を得るには、必要最小量の細菌核酸を獲得するための適当な培養と核酸抽出ならびに遺伝子増幅という予備工程を必要とする。なぜならば、細菌の核酸量は極めて微量であり、非常に低濃度の核酸は効率よく抽出できないこと、または標的核酸は1細菌ゲノムあたり数コピーでしか存在しないからである。

【0004】そこで、メガスフェラ属菌の特異的な配列を利用し、この核酸配列に相補的なオリゴヌクレオチドを用いて、メガスフェラ属菌のみを特異的に検出・同定する方法がある (特願平11-329428)。しかしながら、上記の方法で利用している16S rRNAもしくは16S rDNAの核酸配列は、細菌間で保存性が高い領域であることが知られている。従って、この領域から選択された核酸配列に相補的なオリゴヌクレオチドを用いた場合、検出したい特定の微生物以外の微生物も誤って検出してしまうという可能性は否定できない。一方、分類学的かつ系統学的観点から23S rRNAもしくは23S rDNAは、16S rRNAもしくは16S rDNAと比較してより多くの種に関する情報を含んだ領域である (System. Appl. Microbiol.: 15, 487-501, 1992)。従って、この領域から設計された核酸配列に相補的なオリゴヌクレオチドは、メガスフェラ・セレビスエに極めて特異的な核酸配列である。しかしながら、メガスフェラ・セレビスエの23S rRNA遺伝子の塩基配列は公開されていなかった。

【0005】

【課題を解決するための手段】そこで本発明では、メガスフェラ・セレビスエの23S rRNA遺伝子の塩基配列を提供するものである。本発明の1つの目的は、ビール混濁の原因となるが混濁しないビールには存在しない生物のリボソームRNA (rRNA) およびリボソームDNA (rDNA) 中の独特の核酸配列に相補的なオリゴヌクレオチドを提供するものである。本発明の別の目的は、特異性、感度および速度を併有する核酸ハイブリダイゼーション下においてアクセス可能とされ得る標的領域にハイブリダイズすることができる核酸オリゴヌクレオチドを提供することである。本発明の別の目的は更に、適当なトレーサーで標識したこれらのオリゴヌクレオチドをプローブとして機能させて、ハイブリダイゼーションを行い、当該細菌を選択的に検出同定ならびに定量する方法を提供することである。細菌リボソームは5S、16Sおよび2

3S rRNAと呼ぶ少なくとも3種類のRNA分子を含む。歴史的にこれらの名前は、沈降速度で決定されるRNA分子の大きさに関係している。本発明において、細菌のリボソームRNA (rRNA) は、標的として使用できる。この使用の利点の一つは、rRNAが生きている細胞全てに豊富に存在するという点である。

【0006】本発明をより詳細に開示する前に、説明および請求の範囲で使用する種々の用語を下記のように定義する。「オリゴヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド断片」は天然の (または所望により修飾された) 核酸の情報配列によって特徴づけられ、かつ天然の核酸と同様に、予め定めた条件下で、相補的または実質的に相補的なヌクレオチド断片とハイブリダイズ可能であるヌクレオチド単位の鎖を示す二つの同義用語である。その鎖は天然の核酸とは異なる構造のヌクレオチド単位を含みうる。例えば、オリゴヌクレオチドの構成単位である核酸が天然に存在する核酸に見られるホスホジエステルでなく、他のエステル結合、またはアミド結合 (一般にPNAと呼ばれる) で結合したものであって、標的領域にハイブリダイズできるものであればよい。オリゴヌクレオチド (または、ヌクレオチド断片) は、例えば、100までのヌクレオチド単位を含みうる。一般には、少なくとも10個のヌクレオチド単位を含み、天然の核酸分子から、または遺伝子組換えによって、または化学合成によって得ることができる。

【0007】「ハイブリダイゼーション」は、適切な条件下で、十分に相補的な配列を有するヌクレオチド断片同士が、安定かつ特異的な水素結合によって結合して二本鎖を形成することと理解される。ハイブリダイゼーションの条件は、「ストリンジェンシー」すなわち反応条件の厳しさによって決定される。ハイブリダイゼーションを行うときのストリンジェンシーが高いほど、特異性は高い。つまり、適切なハイブリダイゼーション条件とは、特にプローブ/標的二本鎖の塩基組成、ならびに2個の核酸の間の不一致度から決定され、ハイブリダイゼーション溶液に存在するイオン種の濃度および種類、変性剤の性質および濃度、またはハイブリダイゼーション温度などのハイブリダイゼーション反応パラメーターの関数として表現される。ハイブリダイゼーション反応を行うときの条件のストリンジェンシーは、特に、使用するプローブに依存する。これら全てのデータは周知であり、適切な条件は、通常の技術者の能力の範囲内において、ルーチン実験により各ケースで決定され得る。

【0008】また、「相同である」とは、2個またはそれ以上の核酸配列間の類似の度合いを表すことを意味し、生物間の分類学的な類似度合いを意味するものではない。類似の度合いはパーセンテージで表し、例えば2個の配列間が90%相同であるとは、第1の配列の塩基の90%が第2の配列の塩基と同一にマッチすることを意味する。「プローブ」は、決められた条件下でハイブ

リダイゼーション特異性を有して、本発明の場合は、リボソームRNA、またはリボソームDNA (rDNA) に含まれるヌクレオチド配列を有する標的核酸とハイブリダイゼーション複合体を形成する、例えば、10~100個のヌクレオチド単位、特に12~35個のヌクレオチド単位を含むヌクレオチド断片である。プローブは、検出、同定、定量目的に使用することができる。例えば、放射性同位体、酵素、特に、色素原性、蛍光性または発光性基質に作用し得る酵素（特に、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、色素産生化学化合物、色素原性、蛍光性もしくは発光性化合物、ヌクレオチド塩基の類似体およびビオチンなどのリガンドから選択されるマーカーによって標識できる。

【0009】「プライマー」は、例えば10~100ヌクレオチド単位を含み、かつ例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）などの増幅法、配列決定プロセス、逆転写法などにおける酵素的重合の開始のための決められた条件下でハイブリダイゼーション特異性を有するオリゴヌクレオチドである。本発明に係るオリゴヌクレオチドは、サンプル中の標的核酸の有無の試験において、公知の全てのハイブリダイゼーション技術、特に「ドットプロット」と呼ばれるフィルター上での点付着の技術（MANIATISら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982）、「サザンプロット」と呼ばれるDNA移動の技術（SOUTHERN E.M., Mol. Biol., 98, 503(1975)）、「ノーザンプロット」と呼ばれるRNA移動の技術に従って使用することができる。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明によれば、メガスフェラ・セレビシエと優先的にハイブリダイズする約10~100のヌクレオチド断片が提供される。本発明のヌクレオチド断片は、ビールの混濁の原因となる生物の存在を検出するために有用である。上記ヌクレオチドの少なくとも10個の連続した核酸に対して相補的であるか、またはそれと少なくとも90%相同であるプローブもまた、本発明事項に含む。本発明の1つは、ビール混濁有害菌の23S rRNAまたはrDNAの領域に対して相補的であるか、またはそれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドおよびプローブについてである。詳しくは、その核酸組成物は配列番号1~28に示すプローブ群により定義される配列の群から選択される配列中のいずれか10個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相補的であるかまたはそれと相同である。

【0011】本発明のもう一つは、ビール混濁細菌の存在を検出するためのものである。この方法は、標的細菌を含んでいる疑いのあるサンプルを少なくとも1種類の核酸と接触させる工程を含む。この核酸は、ビール混濁の原因となるメガスフェラ・セレビシエのrRNAまたはrDNAと優先的にハイブリダイズする約10~100ヌクレオチドを有する。この方法は、核酸プローブが標的

rRNAまたはrDNAと優先的に結合して核酸複合体を形成するようにハイブリダイゼーション条件を試料に付与し、そして標的生物（1または2以上）の存在を指示するものとして複合体を検出する工程を含む。好ましくは、本核酸プローブは配列番号1~28に示すプローブ群により定義される配列の群から選択される配列中のいずれか10個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相補的であるかまたはそれと相同である。本発明のプローブは、ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料中のビール混濁生物の特異的検出のための核酸ハイブリダイゼーションアッセイ開発の基礎を提供する。

【0012】本発明のプローブはまた、ビール混濁有害菌の存在を確認するための基礎を提供する。本発明のプローブの開発に際して最初にとられたステップは特異的核酸プローブに対して、標的とするビール有害菌の23S rRNA内の特有な領域を同定することであった。これは、23S rRNA内のどの標的領域が、ビール混濁の原因となるメガスフェラ・セレビシエに対して特異的であるかを見いだすことであった。そこで、これらの実現のためメガスフェラ・セレビシエの23S rDNAの配列を公知の実験プロトコールにより決定し、Megasphaera属菌の進化的近隣細菌であるPectinatus属菌、またはビール有害菌として知られるLactobacillus属菌、またはE. coliを含む他の細菌23S rDNAの配列と比較した。この結果を基に、メガスフェラ・セレビシエに対して特異的なプローブを配列番号1~28のごとく設計した。

【0013】本発明のプローブはfluorescence in situ hybridization（以下FISHと略す）に用いることができる。ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料を、遠心分離またはビール有害細菌を捕捉可能なメンブレンフィルター処理し、試料中に存在するかもしれない標的ビール混濁有害菌と検出プローブとを適切なハイブリダイゼーション条件下で接触させる。検出プローブは標的細菌内の細胞質内に侵入し、そこに存在する23S rRNA内の標的部位に適切なハイブリダイゼーション条件下でアクセスし、ハイブリダイズする。この際に、検出プローブを、放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質等のトレーサー標識をすることで特異的なハイブリダイゼーションの現象を適当な手法によってモニタリングすることができる。たとえば、検出プローブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィ等の方法によってアッセイを実施し、蛍光物質で標識されている場合には蛍光顕微鏡等でアッセイを実施し、化学発光物質で標識されている場合には感光フィルムを用いた解析やCCDカメラを用いたデジタル解析を実施し、標的生物の存在の有無を判定することができる。上記で定義したオリゴヌクレオチドはまた、公知の方法で耐熱性ポリ

メラゼの存在下、メガスフェラ・セレビスエの23S rDNAもしくは23S rRNAを増幅合成するための特異的プライマーとして使用することができる(PCR, RT-PCRなど)。使用するプライマーの組み合わせと適切な反応プログラムの設定により、目的とする核酸が増幅されるかどうかの結果から標的細菌の存在の有無もまた判定可能である。

【0014】

【実施例】本発明を下記実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0015】実施例1 FISH法によるビール有害細菌の検出・同定

ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料からの細菌の捕集は以下の2つの手法を用いて行った。

(1) 遠心分離法による捕集

供試サンプル50mlを遠心チューブに入れ、遠心分離(10,000Xg、10分間、4℃)を行い、上清液を捨て細菌ペレットを回収後、さらに30mlのPBS溶液で同条件で遠心分離し洗浄を行った。洗浄後、細菌ペレットを1mlの固定液(4% w/vのパラホルムアルデヒドを含むPBS)に再けん濁し、4℃で5時間固定した。細菌を固定後、さらに遠心分離により細菌細胞を2回洗浄処理後、適量の50%のエタノールを含むPBSに再けん濁し、FISHに供する細菌液を得た。これらの細菌液をゼラチンでコーティングしたスライドガラス上に一滴のせ風乾後、70%エタノール液、続いて99%エタノール液中にそれぞれ2分間静置し、脱水処理を行い、FISHに供する試験標本とした。FISHに用いるプローブは、5'端をFITC標識した蛍光プローブを使用した。FISHは、50 pmolの蛍光プローブを含むハイブリダイゼーション液(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6) 20μlを上述した試験標本に接触させ、高湿度を保ったチャンバー内で40℃、2時間行った。洗浄は、以下の通り行った。42℃の上述したハイブリダイゼーション液中に20分間、試験標本を静置後、常温の滅菌蒸留水ですすぎ、余分な蛍光プローブを除去した。このハイブリダイゼーションと洗浄を終えた試験標本を風乾後、10μ

g/mlのDAPIを含む褪色防止剤(SlowFade(登録商標); Molecular Probe社)を用いて、全細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

【0016】(2) メンブレンフィルターによる捕集
供試サンプル150mlをポリカーボネート製のメンブレンフィルター(直径47mm、孔径0.4μm)で吸引濾過した後、50mlのPBSで2回洗浄した。続いて10 mlのハイブリダイゼーションバッファー(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6)で洗浄し、FISHに供試した。FISHは、50 pmolの蛍光プローブを含むハイブリダイゼーション液(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6) 200μlをプラスチックシャーレに滴下し、この上に菌体の捕捉されている面が上になるようにフィルターを接触させ、高湿度を保ったチャンバー内で40℃、2時間行った。洗浄は、以下の通り行った。ハイブリダイゼーションの終わったフィルターを吸引濾過装置にセットし、42℃のハイブリダイゼーションバッファー100ml、続いて常温のフィルター濾過した滅菌水50mlを用いて吸引洗浄した。ハイブリダイゼーションと洗浄を終えたメンブレンフィルターを無菌的に風乾後、無蛍光スライドガラス上に細菌捕捉面を上にしてのせ、さらにこの面に直接10μg/mlのDAPIを含む褪色防止剤(SlowFade(登録商標); Molecular Probe社)をのせ、全細胞を染色し、カバーガラスでフィルターを覆い蛍光顕微鏡で観察した。観察画像を図1に示す。

【0017】FITC標識した特異的プローブを用いてFISH解析を行い、蛍光顕微鏡下で観察するとターゲットとなる菌全体が蛍光を発しているのが見える。例えば、FITC標識した配列番号2の相捕鎖プローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行うと、図に示すようにメガスフェラ・セレビスエは蛍光標識されて検出されるが、大腸菌等は検出されない。上述した2つの手法は完全に一致し、その結果は表1の通りであった。表中、○は反応性あり、×は反応性なしを示す。

【0018】

【表1】

菌種	菌株名	プローブ (配列番号) No.								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Megaspheara cerevisiae</i>	DSM20482	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20487	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Selenomonas lactidiflex</i>	DSM20757	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Zymophilus peusivorus</i>	DSM20756	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Zymophilus raffinovorans</i>	DSM20765	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus corniformis</i>	JCM1164	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20690	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM6123	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Escherichia coli</i>	K-12	x	x	x	x	x	x	x	x	x

菌種	菌株名	プローブ (配列番号) No.								
		11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>Megaspheara cerevisiae</i>	DSM20482	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20487	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Selenomonas lactidiflex</i>	DSM20757	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Zymophilus peusivorus</i>	DSM20756	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Zymophilus raffinovorans</i>	DSM20765	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus corniformis</i>	JCM1164	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20690	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM6123	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Escherichia coli</i>	K-12	x	x	x	x	x	x	x	x	x

菌種	菌株名	プローブ (配列番号) No.								
		20	21	22	23	24	25	26	27	28
<i>Megaspheara cerevisiae</i>	DSM20482	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20487	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Selenomonas lactidiflex</i>	DSM20757	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Zymophilus peusivorus</i>	DSM20756	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Zymophilus raffinovorans</i>	DSM20765	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus corniformis</i>	JCM1164	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20690	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM6123	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Escherichia coli</i>	K-12	x	x	x	x	x	x	x	x	x

【0019】また、複数のプローブを同時に用いる手法もある。例えば、プローブ2とプローブ3を同時にFISH解析に供試すると、プローブ2とプローブ3はそれぞれ23S rRNA内の標的領域が異なるため、加算的にシグナルの増強ができた。このように、本発明によって得たプローブを検出したい標的目標に応じて、組み合わせて用いることは有用であった。

【0020】実施例2 FISH法によるメガスフェラ・セレビスエの定量

試料中のメガスフェラ・セレビスエの定量は下記の通り行った。実施例1のごとく試料中の細菌を捕集する直前に、バクトメーターを用いて直接計数管理した大腸菌を試料中に添加し、FISH解析結果を分析することにより得た。例えば、メガスフェラ・セレビスエに汚染されたビールに対し、直接計数法によって管理した大腸菌 (C 個) を混入させ、メガスフェラ・セレビスエの23S rRNA

Aに特異的な配列番号2に示す蛍光標識プローブを用いて実施例1のごとくFISH解析を行った。得られる蛍光画像から、図2のごとくDAPIに染まった菌数 (A) とFITC標識された菌数 (B) を決定し、ビール中に存在したメガスフェラ・セレビスエの数を推定できる。

【0021】蛍光顕微鏡観察により、蛍光を発しない細胞 (大腸菌) と発する細胞 (P菌) の比率からメガスフェラ・セレビスエを定量できる。例えば、メガスフェラ・セレビスエ単独に汚染された試料に10⁷個の大腸菌を添加して回収した検体に対し、蛍光標識した配列番号2の相補鎖プローブを用いてFISH解析を行った場合、蛍光標識されない大腸菌1000個に対し、蛍光標識された細胞 (メガスフェラ・セレビスエ) が10個認められると、メガスフェラ・セレビスエはもとの試料中に10⁵個存在したことになる。すなわち、試験に供したビール中に存在したメガスフェラ・セレビスエ数 (N) は以下の関係

40

50

式で表すことができる。

$$【0022】 N = B \times C / A - B$$

また、メガスフェラ・セレピシエの他、複数の種の細菌によって汚染された試料については、上述した大腸菌の代わりに試料中に存在しない細菌をカウンター株として用いることによって、メガスフェラ・セレピシエの試料中の菌数を推定できる。使用しようとするカウンター株が試料中に存在するか否かは、PCR法による判定から容易に知ることができた。例えば、メガスフェラ・セレピシエとそれ以外の複数種の微生物に汚染されているが、ペクチネイタス・セレピシフィラス (*Pectinatus cerevisiophilus*) に汚染されていないビール中のメガスフェラ・セレピシエ数を知りたい場合を例をとり、以下に説明する。メガスフェラ・セレピシエを含む複数種の微生物汚染ビールに対し、直接計数法によって管理したペクチネイタス・セレピシフィラス (C個) を混入させ、メガスフェラ・セレピシエの23S rRNAに特異的な配列番号2に示す蛍光標識プローブとペクチネイタス・セレピシフィラスの23S rRNAに特異的なローダミンで標識したプローブの共存下に、実施例1のごとくFISH解析を行った。得られた蛍光画像からローダミン標識された菌数 (A) とFITC標識された菌数 (B) を決定し、汚染ビール中に存在したメガスフェラ・セレピシエの数の

推定が可能であった。すなわち、試験に供したビール中に存在したメガスフェラ・セレピシエ数 (N) は以下の関係式で表すことができる。

$$【0023】 N = B \times C / A$$

ここで、カウンター株の23S rRNAと特異的にハイブリダイズするプローブの標識物質は標的細菌特異的なプローブの標的物質と識別できるものであれば良い。

【0024】実施例3 ドットプロットによるメガスフェラ・セレピシエの同定

市販品として入手可能なニトロセルロース、ナイロン、PVDF等のフィルター上に細菌試料から公知の手法により抽出した核酸を固定化した。目的に応じて、プローブはロシュ・ダイアグノスティックス社のDIGオリゴヌクレオチドテイルリングキットを用いて標識し、ハイブリダイゼーションに供した。検出は、ロシュ・ダイアグノスティックス社のDIG発光検出キットを用い、その手順書に従って行い、最終的にフィルターを適当な時間X線フィルムに露光し、ハイブリダイゼーションシグナルの有無から、メガスフェラ・セレピシエの種の同定を行った。ドットプロットの結果を表2に示す。表中、●は反応性あり、点線の○は反応性なしを示す。

【0025】

【表2】

		プローブ(配列番号) No.														
菌株	菌株名	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
<i>Messerschmidia cerevisiae</i>	DSM20482	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
<i>Pectinatus cerevisiophilus</i>	DSM20487	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Selenomonas hortificus</i>	DSM20757	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Zymophilus pasteurianus</i>	DSM20758	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Zymophilus raffinosisporus</i>	DSM20785	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus corniformis</i>	JCM1184	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20890	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM8123	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5888	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Escherichia coli</i>	K-12	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

菌株	菌株名	プローブ(配列番号) No.													
		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
<i>Messerschmidia cerevisiae</i>	DSM20482	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
<i>Pectinatus cerevisiophilus</i>	DSM20487	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Selenomonas heintzi</i>	DSM20757	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Zymophilus pasteurianus</i>	DSM20758	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Zymophilus raffinatus</i>	DSM20785	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus corniformis</i>	JCM1184	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20890	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM8123	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5888	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Escherichia coli</i>	K-12	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>Asahi Breweries Ltd.

<120> A nucleic acid probe for detecting *Megasphaera cerevisiae* and
a me

thod for detecting beer turbidity bacteria

<130> 2000-43P

<160> 28

<210> 1

<211> 2919

<212> DNA

<213> *Megasphaera cerevisiae*

<400> 1

```

aagtcaagta agtaaggga tacggcgat gccttggcca tatcagccga agaaggacgc 60
gataagctgc gaaaagctgc ggtaagggtc aagtaacctg tgaccgcag gtatccgaat 120
ggggaaccc gccagtagga gtactgtcat ctttcgagg aagggcaccc ggtgaactga 180
aacatctaag tagccggagg aaaaggaatc aacagagata cccctagtag cggcgagcga 240
acggggcaga gcccaaaccg ggacgggaaa ccgatccggg gttgcggact gccagcaagc 300
acacagacga agcagaacca gttgggaaac tgggccagag acggtgaaag cccggtaggc 360
gtaaggacgt gagcggggca gtatccagag taccgcgaga cacgaaccgt cttgtgggaa 420
gcagggggga ccaccctcca aggcgaaaca ctgatattga ccgatagcgc atagtaccgt 480
gagggaacgg tgaaaagaac cccgggaggg gaatgaaaga gaacctgaaa ccgtatgtct 540
acaagcagtc gaagcgcttt atatgcgca cggcgtgcct attgaagaat gaaccggcga 600
gttatttcat ccagcgaggt taagcgggaa acgtggagcc gaagcgaag cgagtctgaa 660
tagggcgctc agttggatgg aatagaccgc aaaccacagt gatctatcca tgcccaggtt 720
gaagcacagg taaaatgtg tggaggaccg aaccagtgag cgttgaaaag cttttggatg 780
aggtgtggat aggggtgaaa tgccaatcga acgtggagat agctggttct cccgaaata 840
gctttagggc tagcctcatg gagagagtac aggcggtaga gcaactgaac gggtaggggc 900
ctatccggct actgaaccta atcaaaacta gaatggctgt acttatacat gggagtcaga 960
ctgtgagtaa taaggcccat agtcaagagg gaaacagccc agaccaacag ctaaggtccc 1020
caatgccgia ctaagtggcg aaggatgtgg aatttcgaaa acaaccagga tgttggctca 1080
gaagcagcca cattaaaag agtgcgtaat agctcactgg tcgagagact ctgcgccgaa 1140
gatgaccggg gctaaagtac ggaaccgaag ctttggcatg taggaaacta catgggtagg 1200
ggagcgttcc tgcatggaag aagcctgacc ggaaggacag ttggacaggc aggaagagag 1260
aatgccggta tgagtagcga aaaggaaggt gagaatcctt cccaccgaaa gcctaagggt 1320
tcctgggcaa cgatcgtcga cccagggtaa gtcgggacct aatccgaggc ggagacgct 1380
aggagatgga caacagggtg aaattcctgt accgcaaaag tctgattgag cgatggagtg 1440
acacaagaag gaatgcgcgc atgcgattgg aagagcatgt ccaagcaggt aggtaggtag 1500
tatgataggg aaagccgtca tactgaaagc cgagatgcga tggggagcct ttggagacaa 1560
aggtgaaggg gcagggactc aattgtcgag aaaagcttct agtaaggact taggcgcccg 1620
taccaaaacc gacacaggta ggcaagaaga gaattctaag gtgcgcggga aaaccctcgt 1680
taaggaactc ggcaaaaatg tatccgtaac ttcgggaaaa ggataacca gtaggtgtaa 1740
agtccagaaa cggacggagc cggaatggga ggcagaagag aggcccaagc gactgtttac 1800
cacaaacaca ggctgtctgt aaagcgaag ctgatgtata gatgtgaca cctgcccggt 1860
gctggaaggt taagaggacg tgttagccgc aaggcgaagc agagaattga agccccagta 1920
aacggcgccc gtaactataa cggctcctaag gtagcgaaat tccttgcgg gtaagttccg 1980
accgcacga aaggtgtaac gatttgggca ctgtctcaac gagggaccgg gtgaaattga 2040
agtaacctgt aagcatgcag gtacacccgc gactggacag aaagcaccac atggagcttt 2100
actgtaacct gagattggat tccgtagtaa gatgtacagg atagtggga ggctgggaag 2160
tgagtacgca agtatigaca gagccgatgg tgggatacca accttgtttt attggaattc 2220
taacgagaca cgtaacgagt gtgcggacag tctcaggcgg gcagtttgac tggggcggtc 2280

```

cagagtgtaa aggcagaagg gagcttgact gcgagacgga caggtcgagc agggacgaaa 2400
 gtcgggctta gtgatccggt ggtagagagt ggaattgcc a tcgctcaacg gataaaagct 2460
 accctgggga taacaggctt atctctccca agagtccata tcgacgggga ggtttggcac 2520
 ctcgatgtcg gctcatcaca tcctggggct gaagtaggtc ccaagggttg ggctgttcgc 2580
 ccattaaagt ggtacgcgag ctgggttcag aacgtcgtga gacagttcgg tccctatcca 2640
 tcgccccggg aagaaacttg aaaggggctg ctccctagtag gagaggaccg gaggggacga 2700
 accatggtgt accagtcacg ccgccaggcg tgcagctggg agctacgttc gggacggata 2760
 aacgtgaaa gcatctaagc gtgaaaccag cctagagatg aggtttctca tiacgaaagt 2820
 aagtaaggtc ccatgaagac gacatggtag ataggccggg agtggacgta cagtaatgta 2880
 tggagcggac cggctactaat agaccgagga cttgactta 2919

<210>: 2

<211>: 24

<212>: DNA

<213>: *Megasphaera cerevisiae*

<400>: 2

gggtgccctt cctcgaaagg atga 24

<210>: 3

<211>: 29

<212>: DNA

<213>: *Megasphaera cerevisiae*

<400>: 3

ccccggatcg gtttcccgtc ccggtttgg 29

<210>: 4

<211>: 35

<212>: DNA

<213>: *Megasphaera cerevisiae*

<400>: 4

tcccaactgg ttctgcttcg tctgtgtgct tgctg 35

<210>: 5

<211>: 31

<212>: DNA

<213>: *Megasphaera cerevisiae*

<400>: 5

ccgggctttc accgtctctg gccagtttc c 31

<210>: 6

<211>: 21

<212>: DNA

<213>: *Megasphaera cerevisiae*

<400>: 6

gatactgccc cgctcacgtc c 21

<210>: 7

<211>: 25

<212>: DNA

<213>: *Megasphaera cerevisiae*

<400>: 7

tatcggtcca tatcagtgtt tcgcc 25

<210>: 8

<211>: 23

<212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*
 <400>: 8
 cgtcgcgcat ataaagcgct tcg 23
 <210>: 9
 <211>: 26
 <212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*
 <400>: 9
 aacctcgctg gatgaaataa ctgcc 26
 <210>: 10
 <211>: 26
 <212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*
 <400>: 10
 ccgcctgtac tctctccatg aggcta 26
 <210>: 11
 <211>: 35
 <212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*
 <400>: 11
 aggttcagta gccggatagg ccctacccc gtcca 35
 <210>: 12
 <211>: 22
 <212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*
 <400>: 12
 ctcccatgta taagtacagc ca 22
 <210>: 13
 <211>: 27
 <212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*
 <400>: 13
 gttgttttcg aaattccaca tccttcg 27
 <210>: 14
 <211>: 32
 <212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*
 <400>: 14
 taccatgta gtttcctaca tgccaaagct tc 32
 <210>: 15
 <211>: 28
 <212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*
 <400>: 15
 gtcaggcttc ttccatgcag gaacgctc 28
 <210>: 16
 <211>: 30
 <212>: DNA
 <213>: *Megasphaera cerevisiae*

<400>: 16	
ctctcttcct gcctgtccac ctgtccttcc	30
<210>: 17	
<211>: 26	
<212>: DNA	
<213>: <i>Megasphaera cerevisiae</i>	
<400>: 17	
gctcaatcag acttttgagg tacagg	26
<210>: 18	
<211>: 30	
<212>: DNA	
<213>: <i>Megasphaera cerevisiae</i>	
<400>: 18	
ccaatcgcat gcgcgcattc cttcttgtgt	30
<210>: 19	
<211>: 26	
<212>: DNA	
<213>: <i>Megasphaera cerevisiae</i>	
<400>: 19	
ccctatcata ctacctacct acctgc	26
<210>: 20	
<211>: 22	
<212>: DNA	
<213>: <i>Megasphaera cerevisiae</i>	
<400>: 20	
cggctttcag tatgacggct tt	22
<210>: 21	
<211>: 30	
<212>: DNA	
<213>: <i>Megasphaera cerevisiae</i>	
<400>: 21	
acctttgtct ccaaaggctc cccatcgcat	30
<210>: 22	
<211>: 26	
<212>: DNA	
<213>: <i>Megasphaera cerevisiae</i>	
<400>: 22	
ctcgacaatt gagtccctgc cccttc	26
<210>: 23	
<211>: 33	
<212>: DNA	
<213>: <i>Megasphaera cerevisiae</i>	
<400>: 23	
ccgtccgttt ctggacttta cctactctgg gtt	33
<210>: 24	
<211>: 22	
<212>: DNA	
<213>: <i>Megasphaera cerevisiae</i>	

<400> 24
 tgcgtactca cttcccagcc tc 22
 <210> 25
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Megasphaera cerevisiae
 <400> 25
 cccaccatcg gctctgtcaa tacttgcgta ctcaatt 37
 <210> 26
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Megasphaera cerevisiae
 <400> 26
 ttagaattcc aataaaacaa ggttggt 27
 <210> 27
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Megasphaera cerevisiae
 <400> 27
 tctgcgcgcg gtttccgtcc gc 22
 <210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Megasphaera cerevisiae
 <400> 28
 tcatgggacc ttacttactt tcgtaatgag 30

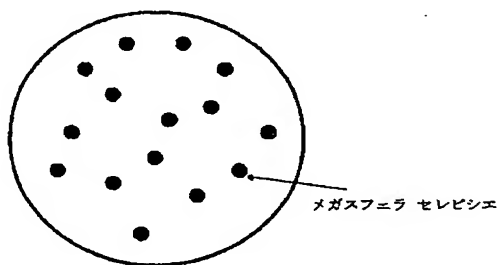
【図面の簡単な説明】

【図1】 FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法によるメガスフェラ・セレビシエの検出結果の蛍光顕

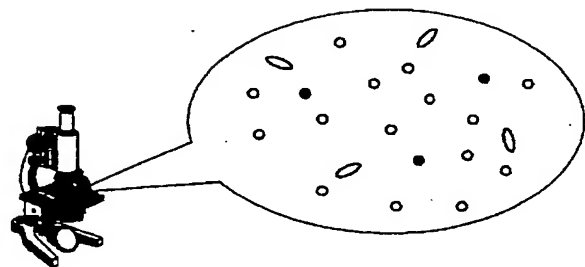
微鏡観察画像。

【図2】 メガスフェラ・セレビシエの定量方法を示す図。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

C 1 2 M 1/34

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

テマコード (参考)

Z N A A

(72) 発明者 高橋 恭子

茨城県北相馬郡守谷町緑 1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA01 CA02 CA09
CA11 CA12 CA20 HA11 HA13
HA14
4B029 AA07 AA21 AA23 BB02 BB20
CC03 FA01
4B063 QA01 QA18 Q006 Q050 Q054
QR08 QR32 QR35 QR39 QR42
QR56 QR62 QR84 QS12 QS13
QS16 QS25 QS34 QS35 QS39
QX01 QX02 QX07 QX10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.